



Replication Machinery

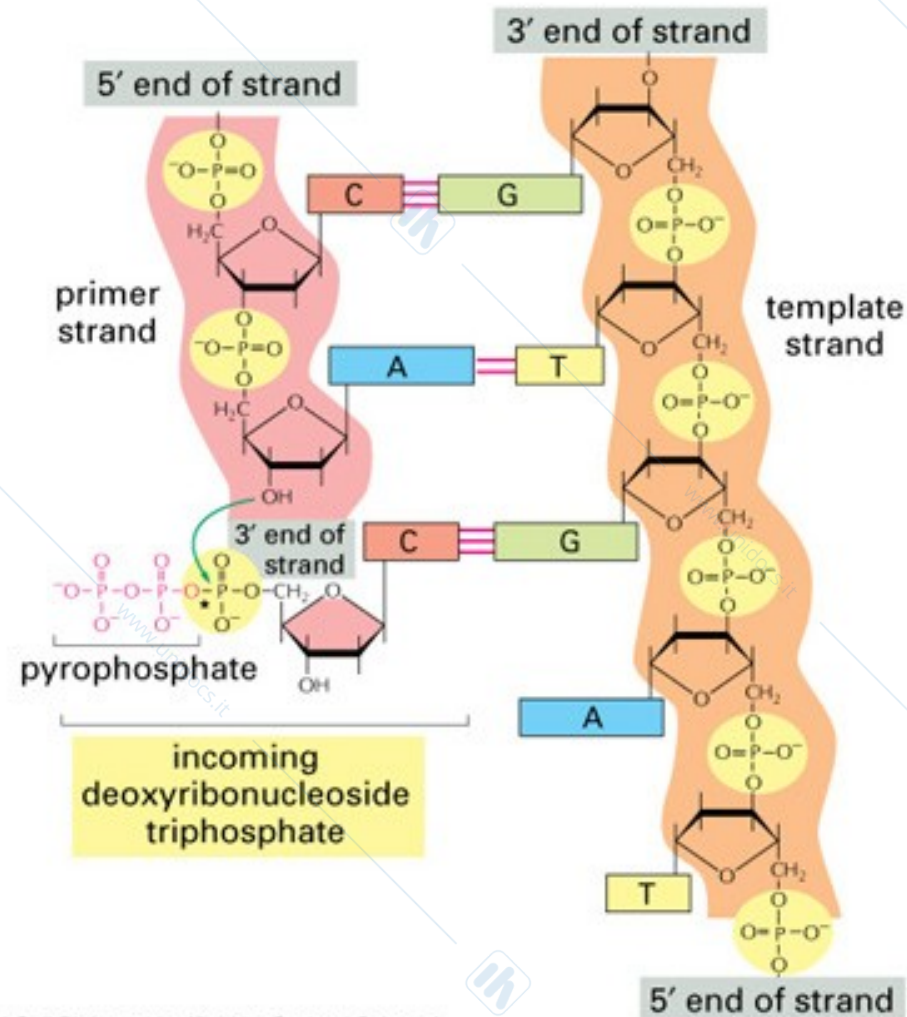
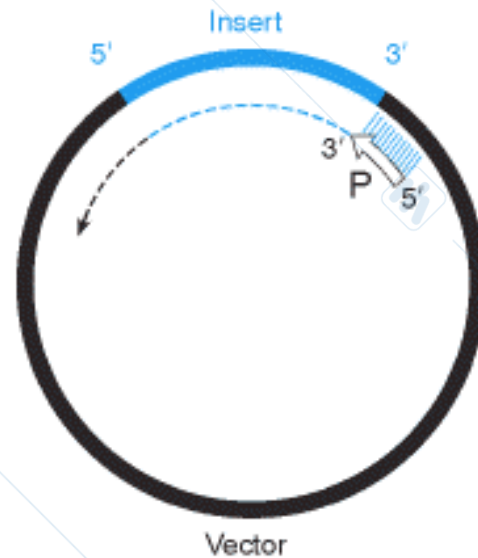


Figure 6-10 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

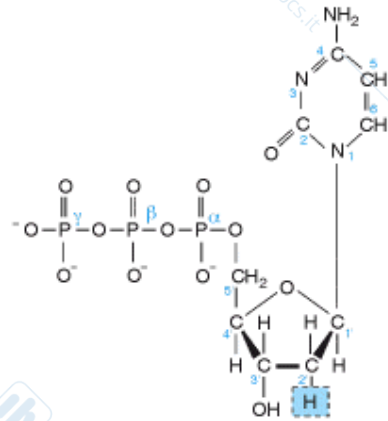
Sequenziamento del DNA

Metodo enzimatico (Sanger)

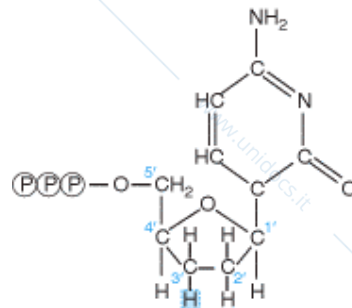


Si utilizza una reazione polimerasica con un oligonucleotide di innesco
Si basa sull'uso di didesossi-nucleotidi, che possono essere incorporati nella catena nascente ma la bloccano.

L'inserimento di un didesossi-nucleotide nella catena nascente blocca la sintesi

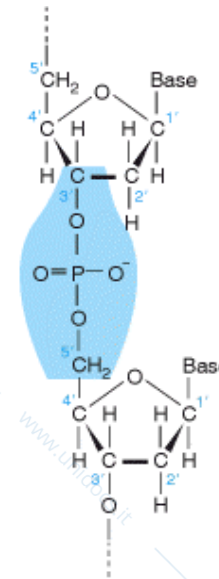


2' desossi-CTP 5' trifosfato



2', 3' didesossi-CTP 5' trifosfato

Key:
(P) Phosphate group



Legame fosfodiesterico

5'

3'

TTACGTAACGTCAGAACGTCCGGAACGTAGGGGTCGCGCGTT

3'

5'

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

5'

3'

TTACGTAACGTCA

5'

3'

TTACGTAACGTCAGAACGTCCGGAACGTAGGGGTTCGCGCGTT

5'

3'

TTACGTAACGTCA

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

3'

5'

TTACGTAACGTCAGAACGTCCGGAACGTAGGGGTCGCGCGTT
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

5'

3'

3'

5'

5'

3'

TTACGTAACGTCAGAACGTCCGGAACGTAGGGGTCGCGCGTT

3'

5'

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

5'

3'

TTACGTAACGTCAGAACGTCCGGAACGTAGGGGTTCGCGCGTT

5'

3'

TTACGTAACGTCA

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

3'

5'

dA dC dG dT + DNA Polimerasi

5'

3'

TTACGTAACGTCAGAACGTCCGGAACGTAGGGGGTCGCGCGTT

5'

3'

TTACGTAACGTCAGAACGTCCGGAACGTAGGGGGTCGCGCGTT

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

3'

5'



5'

3'

TTACGTAACGTCAGAACGTCCGGAACGTAGGGGTTCGCGCGTT

5'

3'

TTACGTAACGTCA

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

3'

5'

dA dC dG dT

ddA ddC ddG ddT

+ DNA Polimerasi

TTACGTAACGTCAG**G**

14

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**A**

15

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**A**

16

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**AAC**

17

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**AACG**

18

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**AACGT**

19

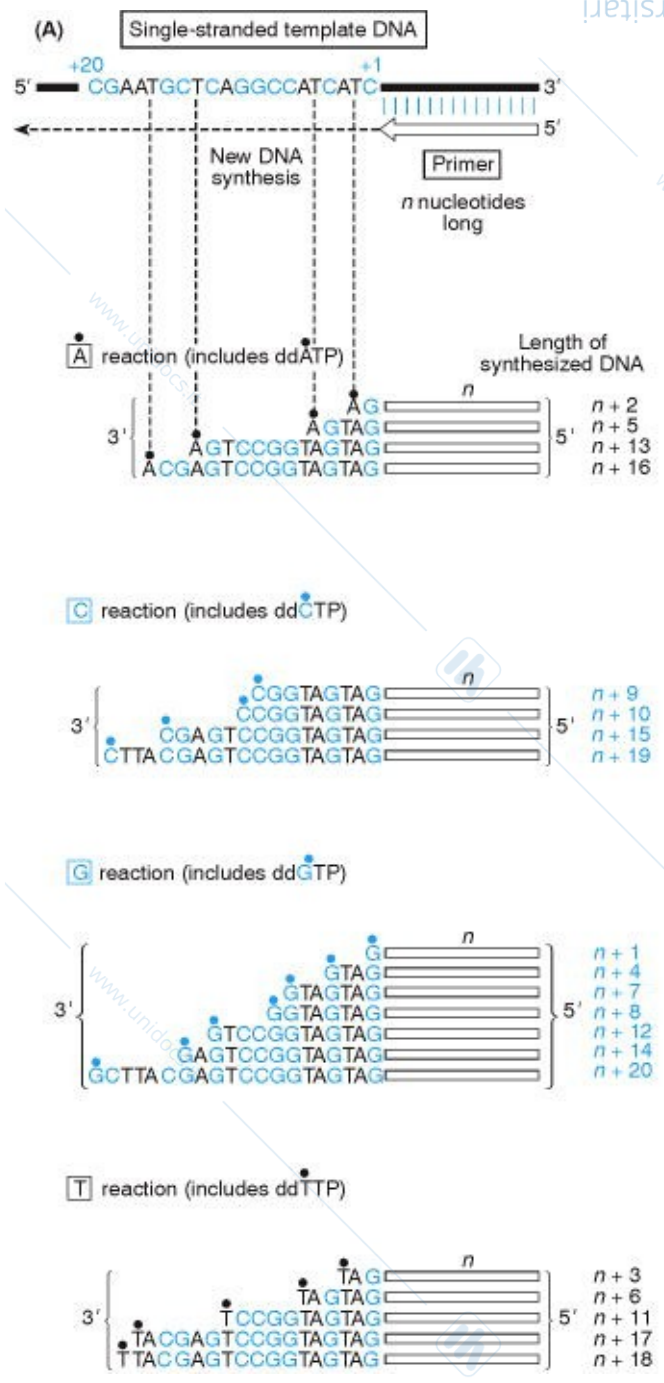
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

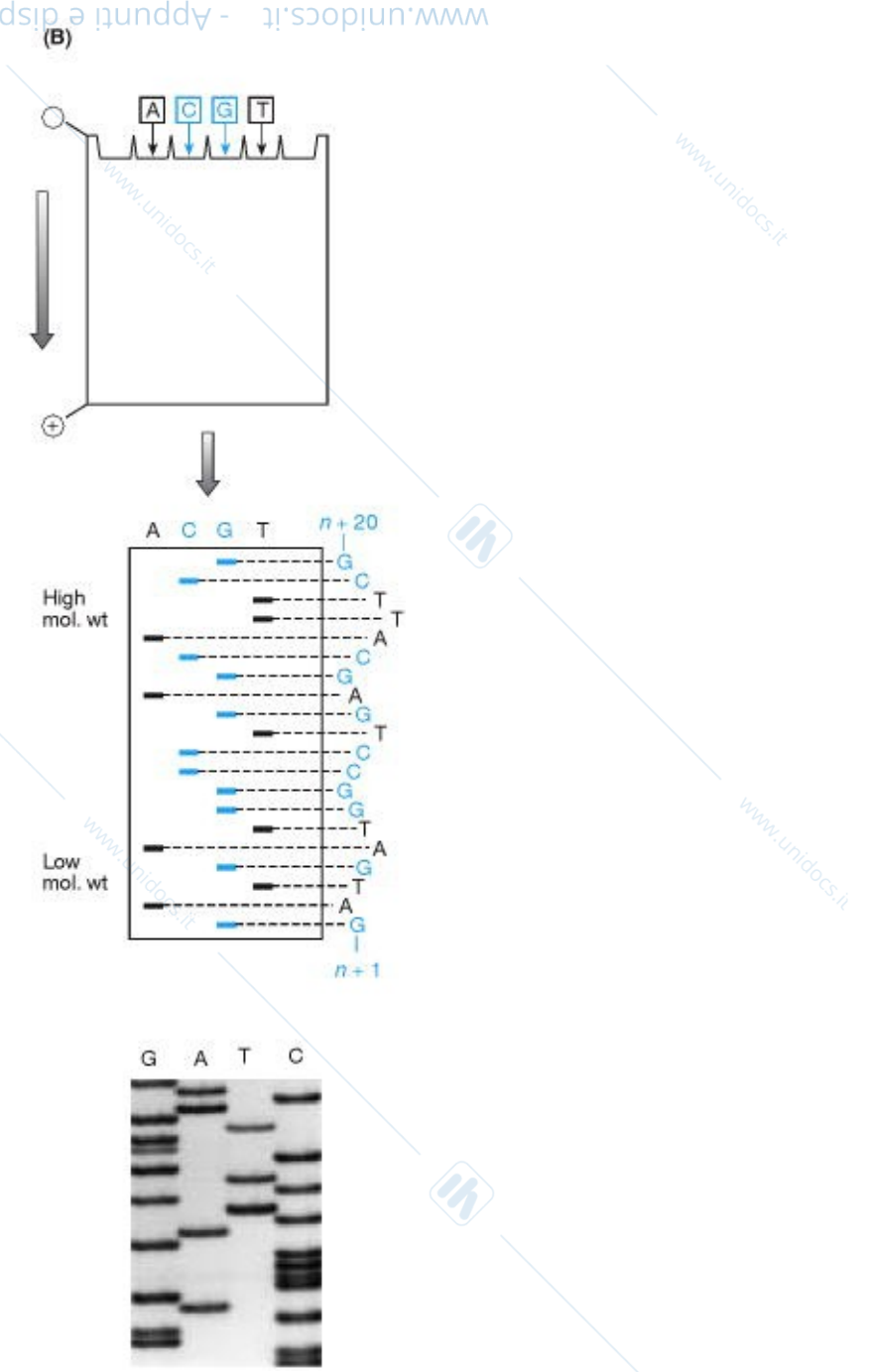
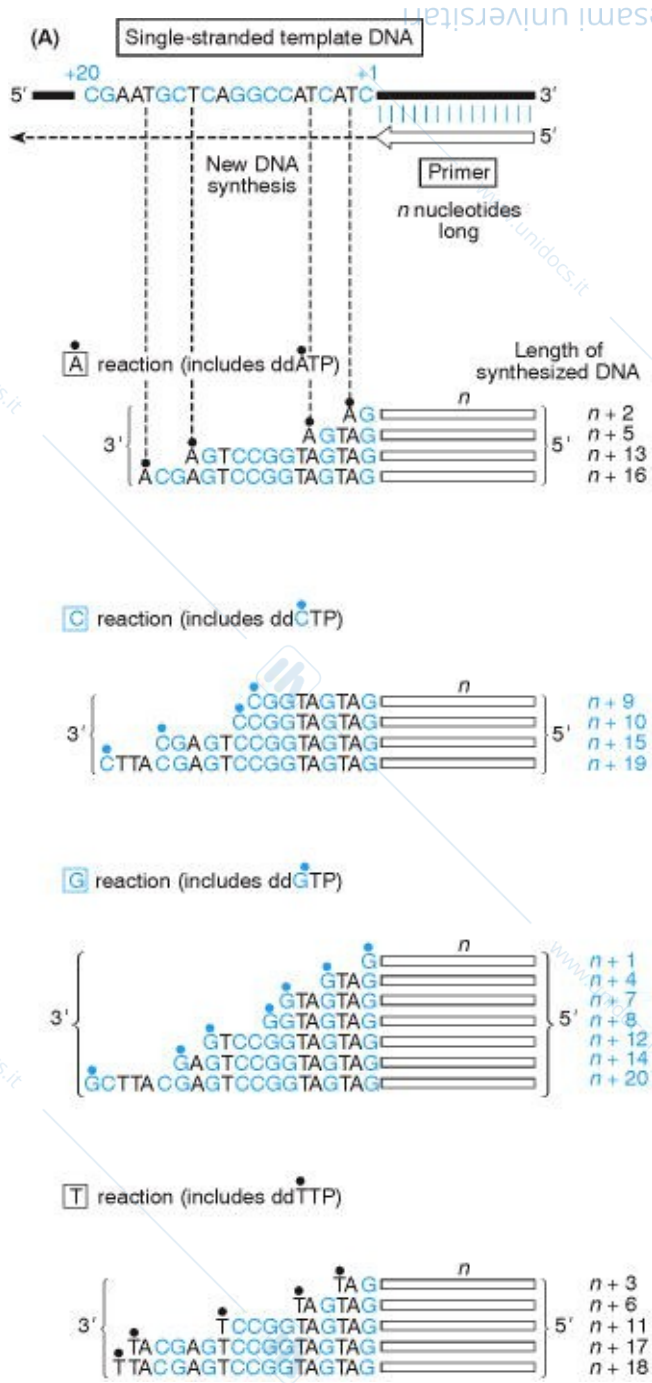
TTACGTAACGTCAG**AACGTC**

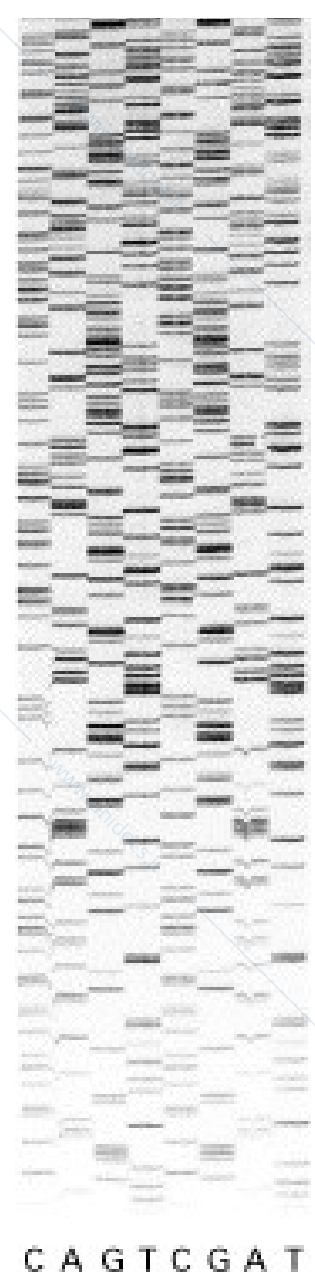
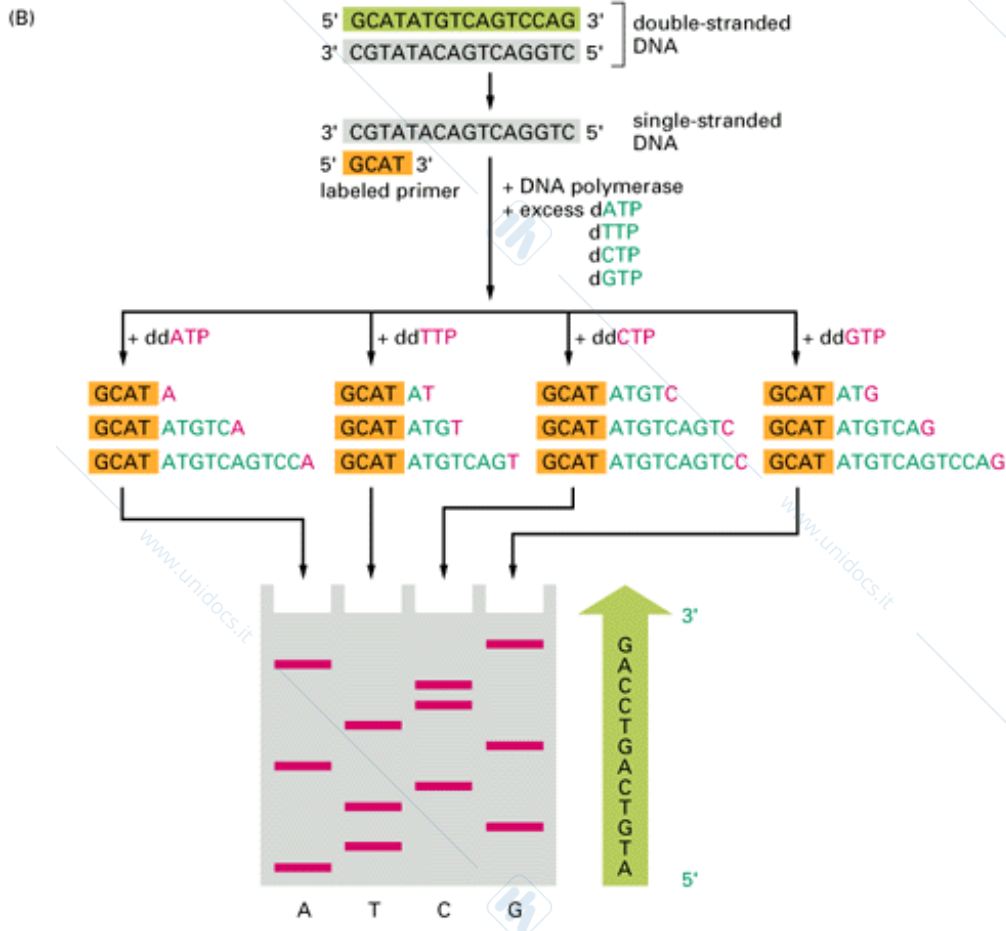
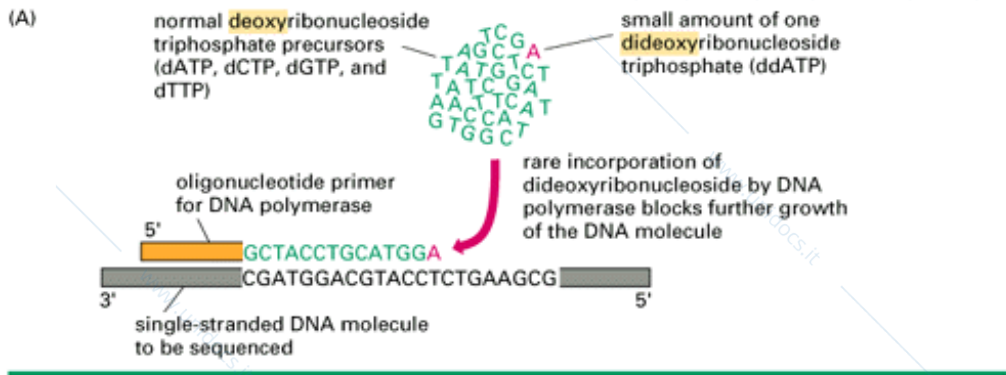
20

AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

Sequenziamento manuale con uso di nucleotidi radioattivi:







IL SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO DEL DNA

E' possibile determinare la sequenza nucleotidica di una regione di DNA, a partire da una soluzione di DNA amplificato e purificato, utilizzando un sistema di apparecchiature che determinano e visualizzano automaticamente il risultato

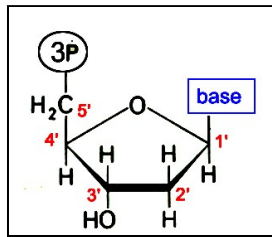
→ **SEQUENZIATORE AUTOMATICO**



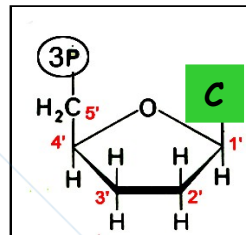
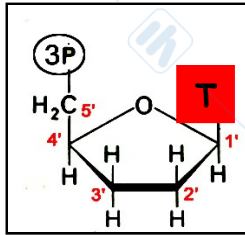
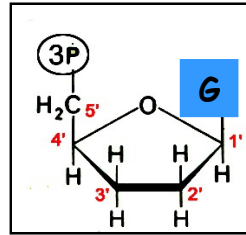
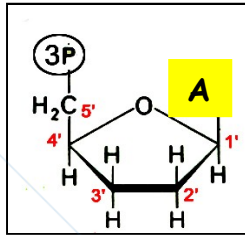
REAZIONE di SEQUENZA con TERMINATORI 'BigDye'

E' una reazione di PCR modificata in cui viene inserito un reagente in più

→ miscela di 4 TERMINATORI:



dNTP



ddNTPs

➤ un terminatore è un **DI-DEOSSINUCLEOTIDE** (ddNTP), cioè un nucleotide del DNA che in posizione 3' reca un atomo di ossigeno in meno → se durante la sintesi di un filamento di DNA viene inserito un ddNTP **LA SINTESI SI BLOCCA**

➤ i quattro ddNTP terminatori sono coniugati ('marcati') a quattro diversi **FLUOROCROMI** → molecole che se colpite da un raggio di luce **EMETTONO FLUORESCENZA**

In tale reazione ad ogni ciclo di sintesi in ogni posizione del frammento di DNA possono verificarsi 2 condizioni:

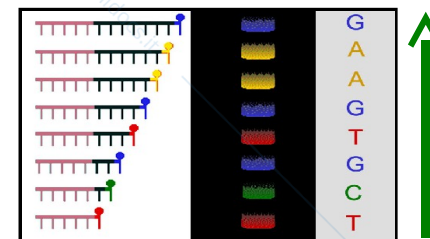
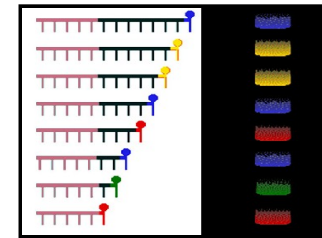
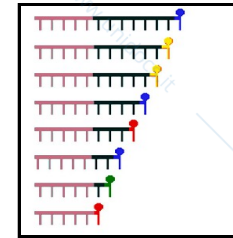
1. Viene incorporato un dNTP → **LA SINTESI PROCEDE**
2. Viene incorporato un ddNTP → **LA SINTESI SI BLOCCA**

Al termine della reazione si ottiene una miscela di frammenti di DNA di lunghezze diverse che differiscono per un singolo nucleotide e che terminano un ddNTP marcato.

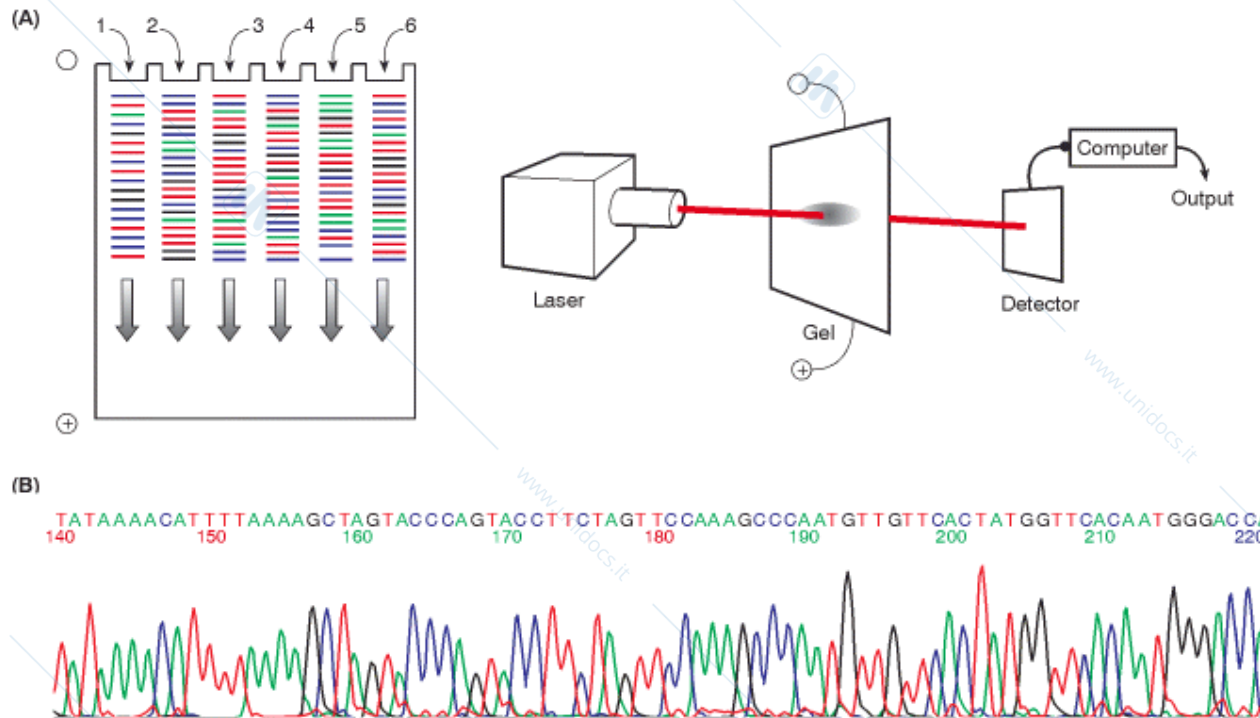
VISUALIZZAZIONE di RISULTATI:

All'interno del sequenziatore:

- i frammenti della miscela vengono separati e ordinati secondo la loro lunghezza
- colpiti da un raggio di luce laser che eccita i fluorocromi coniugati ai terminatori
- viene rilevata una emissione di fluorescenza di colore diverse per ognuno dei quattro terminatori
- un software ricostruisce la sequenza del frammento iniziale di DNA abbinando a ciascuna emissione luminosa il corrispondente ddNTP



Sequenziamento automatizzato



Elettroferogramma

